

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-267953

(43)Date of publication of application : 25.09.2003

(51)Int.Cl.

C07D213/70  
A01N 25/08  
A01N 43/40  
// A61K 7/00  
A61K 31/444  
A61L 9/01  
A61P 31/04

(21)Application number : 2002-072558

(71)Applicant : KOMA HIROKI  
NIHON FUNEN CO LTD  
OTSUKA CHEMICAL HOLDINGS CO LTD

(22)Date of filing : 15.03.2002

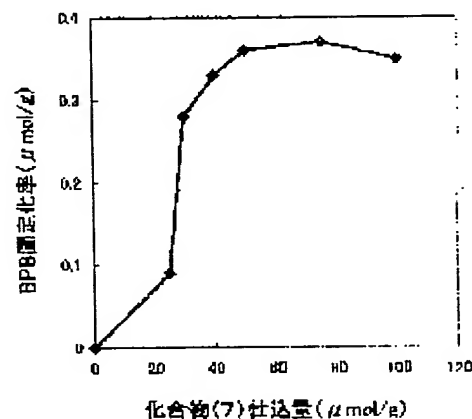
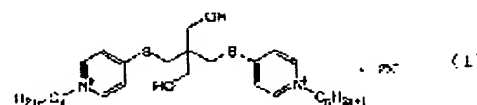
(72)Inventor : KATAOKA DAIYA

(54) BIS TYPE QUATERNARY AMMONIUM SALT COMPOUND AND ANTIMICROBIAL AGENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new bis type quaternary ammonium salt compound having a high antimicrobial activity and a wide antimicrobial spectrum with no or extremely slight lowering of antimicrobial activity by fixing thereof on an inorganic material as opposed to a conventional quaternary ammonium salt compound.

SOLUTION: The bis type quaternary ammonium salt compound is represented by formula (1) [wherein, n denotes 8, 10, 12, 14, 16 or 18; and X denotes a halogen atom].



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-267953

(P2003-267953A)

(43) 公開日 平成15年9月25日 (2003.9.25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 0 7 D 213/70		C 0 7 D 213/70	4 C 0 5 5
A 0 1 N 25/08		A 0 1 N 25/08	4 C 0 8 0
43/40	1 0 1	43/40	1 0 1 K 4 C 0 8 3
// A 6 1 K 7/00		A 6 1 K 7/00	D 4 C 0 8 6
31/444		31/444	4 H 0 1 1
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-72558 (P2002-72558)

(22) 出願日 平成14年3月15日 (2002.3.15)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年11月2日  
日本防菌防黴学会開催の「日本防菌防黴学会2001年度合同大会」において文書をもって発表

(71) 出願人 501046958

高麗 寛紀

徳島県徳島市川内町富吉230-2

(71) 出願人 391016886

日本フネン株式会社

徳島県麻植郡川島町大字三ツ島字新田179

番地の1

(71) 出願人 000206901

大塚化学ホールディングス株式会社

大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号

(74) 代理人 100081536

弁理士 田村 巖

最終頁に続く

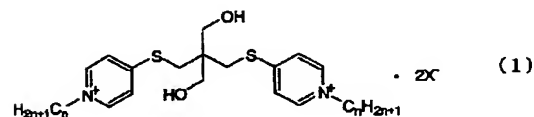
(54) 【発明の名称】 ビス型第四アンモニウム塩化合物及び抗菌剤

(57) 【要約】

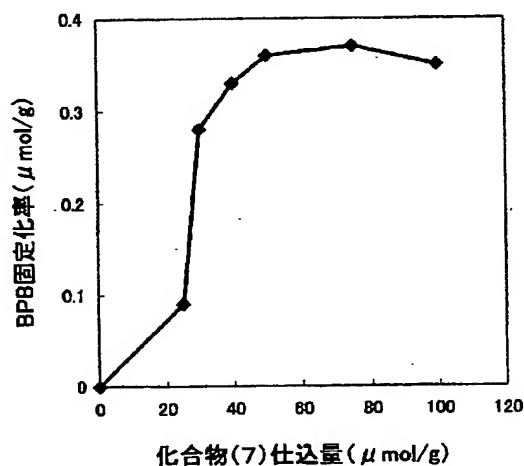
【課題】 高い抗菌活性と広い抗菌スペクトルを有し、しかも、既知の第四アンモニウム塩化合物の様に、無機材料への固定化による抗菌活性の低下がない又は極めて少ない新規なビス型第四アンモニウム塩化合物を提供する。

【解決手段】 式(1)で表わされるビス型第四アンモニウム塩化合物。

【化1】



【式中、nは8、10、12、14、16又は18を示す。Xはハロゲン原子を示す。】

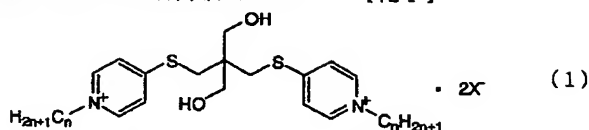


【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(1)で表わされるビス型第四アンモニウム塩化合物

\* ニウム塩化合物。

【化1】



〔式中、nは8、10、12、14、16又は18を示す。Xはハロゲン原子を示す。〕

【請求項2】 請求項1のビス型第四アンモニウム塩化合物を有効成分として含有する抗菌剤。

【請求項3】 請求項1のビス型第四アンモニウム塩化合物を無機材料に固定化してなる請求項2に記載の抗菌剤。

【請求項4】 無機材料が多孔質ガラス、発泡ガラス、発泡珪藻土である請求項3に記載の抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

【0001】本発明は、ビス型第四アンモニウム塩化合物及び抗菌剤に関する。本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物は、従来のビス型第四アンモニウム塩化合物と同等の優れた抗菌性能を示し、人体に対する安全性が\*

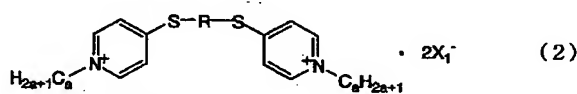
※高く、更に、ガラス粉末へ固定化した時に抗菌性能の低下が著しく少ないという好ましい特性を有し、抗菌剤として非常に有用である。

10 【従来の技術】

【0002】従来から、優れた抗菌性能(高い抗菌活性と広い抗菌スペクトル)を示し、且つ人体に対する安全性の高いビス型第四アンモニウム塩化合物が提案されている。その具体例としては、例えば、式(2)で表わされるビス型第四アンモニウム塩化合物(特開平6-32190号公報)、式(3)で表わされるビス型第四アンモニウム塩化合物(特開2000-95763号公報)等を挙げることができる。

【0003】

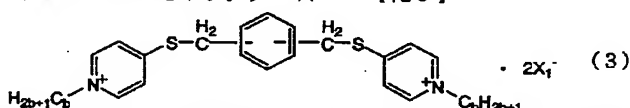
【化2】



〔式中、Rは炭素数2～18のアルキレン基を示す。aは6～18の整数を示す。X<sub>1</sub>はアニオンを示す。〕

★【0004】

★【化3】



〔式中、bは1～18の整数を示す。X<sub>1</sub>は上記に同じ。〕

【0005】一方、第四アンモニウム塩等を抗菌剤として使用するに際し、該第四アンモニウム塩を水や有機溶媒等の液状物に溶解又は分散する以外に、ガラスビーズや多孔質ガラス等のガラス粉末に固定化するのが、有力な手段の一つになっている。具体的には、例えば、多孔質ガラス等に第四アンモニウム塩化合物を固定化してなる抗菌剤(特開昭60-16904号公報)、多孔質ガラス、セラミック、ゼオライト等にアルコール性水酸基含有フェノール化合物を固定化してなる抗菌剤(特開昭61-268258号公報、特開平4-104835号公報、特開平5-277167号公報等)等が提案されている。第四アンモニウム塩をガラス粉末に固定化することにより、抗菌剤としての適用範囲が拡大し、例えば、合成樹脂やセラミックス等の固体マトリックスへの配合が非常に容易になる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来の第四アンモニウム塩、特にビス型第四アンモニウム塩化合物は優れた抗菌性能を有しているにもかかわらず、こ

30 れらをガラス粉末に固定化する場合、十分な量を固定化することができず、そのため、その優れた抗菌性能が十分に発揮されず、抗菌活性が著しく低下するという欠点がある。本発明の目的は、高い抗菌活性と広い抗菌スペクトルを有し、しかも、既知の第四アンモニウム塩化合物の様に、ガラス粉末への固定化による抗菌活性の低下がない又は極めて少ない新規なビス型第四アンモニウム塩化合物を提供することにある。

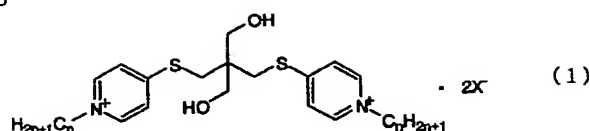
【0007】本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、抗菌剤として有用な、新規なビス型第四アンモニウム塩化合物を得ることに成功し、本発明を完成した。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、式(1)で表わされるビス型第四アンモニウム塩化合物(以下「ビス型第四アンモニウム塩化合物(1)」という)、及び、ビス型第四アンモニウム塩化合物(1)を有効成分として含有する抗菌剤に係る。

【0009】

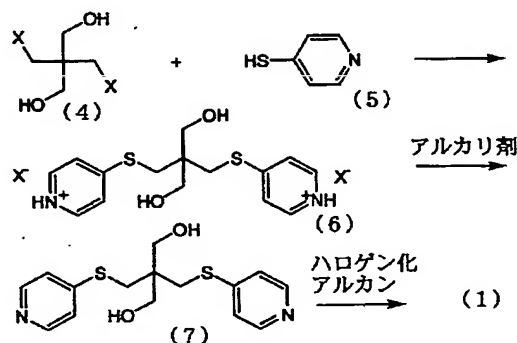
【化4】



〔式中、nは8、10、12、14、16又は18を示す。Xはハロゲン原子を示す。〕

【0010】本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)は、従来のビス型第四アンモニウム塩と同等の抗菌性能(抗菌活性及び抗菌スペクトル)を示すと共に、ガラス粉末に固定化する場合には、従来のビス型第四アンモニウム塩よりも多量に固定化することができるという特性を有しているため、ガラス粉末に固定化した時も、優れた抗菌活性が発揮され、特に細菌や真菌類に有効である。従って、応用範囲が広い実用的な抗菌剤になり、例えば、合成樹脂等への配合が非常に容易になる。\*

〔反応工程式1〕



〔式中、Xは上記に同じ。〕

【0014】即ち、2,2-ビス(ハロメチル)-1,3-プロパンジオール(4)と4-メルカプトピリジン(5)とを反応させて、4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウムハライド)(6)を合成し、これにアルカリを作用させて、4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)(7)を合成し、これとハロゲン化アルカンとを反応させることにより、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)を得ることができる。

【0015】2,2-ビス(ハロメチル)-1,3-プロパンジオール(4)と4-メルカプトピリジン(5)との反応は、例えば、低級アルコール中にて還流下に行なわれ、通常5~80時間、好ましくは24~36時間で終了する。2,2-ビス(ハロメチル)-1,3-プロパンジオール(4)の具体例としては、例えば、2,2-ビス(ヨードメチル)-1,3-プロパンジオール、2,2-ビス(ブロモメチル)-1,3-プロパンジオール、2,2-ビス(クロロメチル)-1,3-プロパンジオール等を挙げることができる。化合物(4)と化合物(5)との使用割合は、通常、化合物(4)1モルに対して化合物(5)を2モル以上、好ましくは2~2.5

\*【0011】

〔発明の実施の形態〕上記式(1)において、Xで示されるハロゲン原子としては、例えばヨウ素、塩素、臭素等を挙げることができる。

【0012】本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)は、文献未載の新規化合物である。該ビス型第四アンモニウム塩化合物(1)は、例えば、下記の反応工程式1の方法に従って製造できる。

【0013】

〔化5〕

モル使用すればよい。低級アルコールとしては公知のものを使用でき、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等を挙げることができる。これらの中でも、エタノールが特に好ましい。低級アルコールの使用量は特に制限されないが、反応が円滑に進行する量を適宜選択すればよい。

【0016】上記の、化合物(4)と化合物(5)との反応により、4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウムハライド)(6)を含む反応混合物が得られる。これにアルカリ剤を加え、化合物(6)にアルカリ剤を作用させると、化合物(6)からハロゲン化水素が脱離し、4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)(7)が得られる。アルカリ剤としては公知のものを使用でき、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等を挙げることができる。アルカリ剤の使用量は特に制限はないが、通常、化合物(6)の1モルに対して、アルカリ剤を2モル以上、好ましくは2~3モル使用すればよい。アルカリ剤は通常水溶液の形態で使用され、該水溶液中のアルカリ剤の濃度は通常0.05~1Nとし、上記使用量の範囲に入るようにアルカリ剤水溶液の添加量を適宜調整すればよい。この反応により得られる4,4'-(2,2-ジ

ヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)(7)は、再結晶等の通常の分離精製手段に従って、反応混合物中から容易に単離精製できる。

【0017】次いで、得られる4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)(7)とハロゲン化アルカンとを反応させることにより、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)が得られる。化合物(7)とハロゲン化アルカンとの反応は、通常、常圧下、低級アルコール中にて、80~120℃の温度下に行なわれ、24~72時間で終了する。還流下に行うこともできる。

【0018】また、化合物(7)とハロゲン化アルカンとの反応は、加圧下に行うこともできる。加圧下に行う場合は、圧力は60~100MPa、反応温度は60~100℃及び反応時間は20~40時間程度とすればよい。低級アルコールとしては上記と同様のものを使用でき、それらの中でもエタノールが好ましい。低級アルコールの使用量は特に制限されず、原料となる化合物(7)及びハロゲン化アルカンの使用量等に応じて、本反応が円滑に進行する量を適宜選択すればよい。

【0019】ハロゲン化アルカンとしては公知のものを使用でき、例えば、式(8)で表わされるハロゲン化アルカン(8)を挙げることができる。



〔式中、n及びXは上記に同じ。〕

【0020】該ハロゲン化アルカン(8)の具体例としては、例えば、ヨードオクタン、ヨードデカン、ヨードドデカン、ヨードテトラデカン、ヨードヘキサデカン、ヨードオクタデカン、ブロモオクタン、ブロモデカン、ブロモドデカン、ブロモテトラデカン、ブロモヘキサデカン、ブロモオクタデカン、クロロオクタン、クロロデカン、クロロドデカン、クロロテトラデカン、クロロヘキサデカン、クロロオクタデカン等を挙げることができる。これらは1種を単独で使用でき又は必要に応じて2種以上を併用できる。ハロゲン化アルカンの使用量は、通常化合物(7)1モルに対して2モル以上、好ましくは2~2.5モル程度とすればよい。

【0021】この様にして得られる本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)は、濃縮、再結晶等の通常の分離精製手段に従い、反応混合物中から容易に単離精製できる。

【0022】本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)は、従来の第四アンモニウム塩と同様の形態で抗菌剤として使用できる。例えば、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)の粉末を適当な溶媒、例えば、水、アルコール類等に溶解又は分散し、液状抗菌剤にして用いてもよい。この液状抗菌剤は、従来のものと同様に、そのまま医療用や家庭用の消毒用抗菌剤として用いることができる。その際、ビス型第四アンモニウム

塩化合物(1)の濃度は特に制限されず、用途等に応じて広い範囲から適宜選択すればよいが、通常、液状抗菌剤全量の0.0001~5重量%、好ましくは0.001~0.1重量%とすればよい。また、この液状抗菌剤を紙、セラミックス、ガラス、金属、木材、合成樹脂等の1種又は2種以上から構成される各種物品の表面に塗布又は噴霧して用いることができる。

【0023】更に、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)は、無機材料に固定化して使用することもできる。該無機材料の中でも多孔質のものが好ましい。該無機材料の具体例としては、例えば、板ガラス、結晶化ガラス、多孔質ガラス、発泡ガラス、発泡廃ガラス等のガラス質材料、シリカ、アルミナ、タルク、クレイ、水酸化アルミニウム、鉄、マイカ、アスベスト、酸化チタン、亜鉛華、酸化鉄、炭酸カルシウム、硫酸バリウム、活性炭等を挙げることができる。これらの中でも、ガラス質材料が好ましく、多孔質ガラス、発泡ガラス、発泡廃ガラス等が特に好ましい。無機材料は1種を単独で使用でき又は2種以上を併用できる。固定化は、例えば、ガラス粉末を例にとると、ガラス粉末と本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)とを混合することにより行なわれる。好ましくはその際にトリ低級アルコキシシランを併用するのが良く、更にガラス粉末とトリ低級アルコキシシランとを反応させて得られる表面が予め活性化(シリル化)されたガラス粉末、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)及びトリ低級アルコキシシランを用いるのが特に好ましい。

【0024】ガラス粉末としては公知のものをいずれも使用でき、例えば、上記結晶化ガラス、多孔質ガラス、発泡ガラス、発泡廃ガラス、ガラスビーズ等を挙げることができる。ガラス粉末の粒径は特に制限されないが、通常100μm~50mm程度とすればよい。活性化に先立ち、ガラス粉末に脱脂処理を施してもよい。トリ低級アルコキシシランとしても公知のものを使用でき、例えば、トリメトキシシラン、トリエトキシシラン等を挙げることができる。トリ低級アルコキシシランによるガラス粉末表面の活性化(シリル化)は、公知の方法に従って実施でき、例えば、トリ低級アルコキシシランを適当な有機溶媒に溶解し、これにガラス粉末を加え、60~100℃の温度下に濃縮し、更に必要に応じて水を加えて前記と同様に濃縮し、得られる残渣を80~150℃で0.5~12時間乾燥することにより行なわれる。有機溶媒としては、トリ低級アルコキシシランを溶解し得るものであれば特に制限されず、例えば水、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等の公知のものを使用できる。ガラス粉末とトリ低級アルコキシシランとの使用割合は特に制限されないが、通常ガラス粉末100重量部に対し、トリ低級アルコキシシランを0.1~3重量部程度使用すればよい。

【0025】無機材料と本発明のビス型第四アンモニウム



ム塩化合物(1)との使用割合は特に制限されないが、通常無機材料100重量部に対して化合物(1)を0.1~1重量部使用すればよい。また、トリ低級アルコキシシランの使用量も特に制限はないが、通常化合物(1)の1モルに対して2モル以上、好ましくは2~2.5モルとすればよい。無機材料と本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)とトリ低級アルコキシシランとの混合は、80~150℃の温度下に行なわれ、0.5~48時間程度で終了する。

【0026】また、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)のガラス粉末への固定化は、上記の方法で得られる活性化(シリル化)ガラス粉末と、本発明化合物(1)の中間体である4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)(7)とトリ低級アルコキシシランとを反応させ、ガラス粉末表面に化合物(7)を固定化し、更に該化合物(7)とハロゲン化アルカンとを反応させ、該化合物(7)を4級化することによっても行なうことができる。

【0027】活性化ガラス粉末と化合物(7)とトリ低級アルコキシシランの反応は、上記ガラス粉末の活性化と同様に実施できる。即ち、化合物(7)とトリ低級アルコキシシランとを低級アルコール又は低級アルコールと水との混合溶媒に溶解し、これに活性化ガラス粉末を加え、45~80℃の温度下に濃縮し、更に必要に応じて水を加えて前記と同様に濃縮し、得られる残渣を100~150℃で0.5~10時間乾燥することにより行なわれる。トリ低級アルコキシシランとしては上記と同様のものを使用できる。低級アルコールとしては特に制限はないが、エタノールが好ましい。活性化ガラス粉末と化合物(7)との使用割合は特に制限されないが、通常活性化ガラス粉末100重量部に対して化合物(7)を0.1~1重量部使用すればよい。また、トリ低級アルコキシシランの使用量も特に制限はないが、通常化合物(7)の1モルに対して2モル以上、好ましくは2~2.5モルとすればよい。この反応により、その表面に化合物(7)が固定化されたガラス粉末を得ることができる。

【0028】ガラス粉末上に固定化された化合物(7)の四級化は、化合物(7)を固定化したガラス粉末をエタノール等の低級アルコールで湿潤し、これに、ガラス粉末上に固定化された化合物(7)1モルに対し2モル以上、好ましくは2~2.5モル量のハロゲン化アルカンを加え、80~100℃の温度下に20~40時間反応させることにより行なわれる。反応後、必要に応じ、エタノール等の低級アルコールで洗浄し、乾燥することによって、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)が固定化されたガラス粉末を得ることができる。

【0029】この様にして得られる、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物を固定化したガラス粉末は、例

えば、これを合成樹脂に練り込み、繊維や糸、フィルム、シート、立体物等の任意の形状に成形して用いることができる。

【0030】本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)を有効成分とする抗菌剤は、従来の第四アンモニウム塩と同様に、例えば、防菌防臭加工繊維製品、皮革製品、建材、木材、塗料、接着剤、プラスチック成形品、紙、パルプ、金属加工油、食品、医療、化粧品、文房具、畜産分野等における抗菌剤として幅広くその応用が期待できる。

【0031】

【実施例】以下に実施例及び試験例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、何らこれらに限定されるものではない。

【0032】実施例1

4-メルカプトピリジン22.2g(0.20モル)をエタノール100mlに溶解し、この溶液に2,2-ビス(プロモメチル)-1,3-プロパンジオール27.8g(0.10モル)を滴下した後還流し、ピリジニウム塩を得た。これに0.1N水酸化ナトリウムを加えてpH11に調整することにより脱臭化水素化し、水とエタノールで再結晶し、4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)を製造した。収量29.1g(収率90.2%)。

【0033】

a) 元素分析

	H	C	N
理論値	5.63	55.87	8.69
分析値	5.63	55.67	8.93

b)  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  ppm

8.26 (4H, dd,  $J=1.5\text{Hz}$ )、7.35 (4H, dd,  $J=1.6\text{Hz}$ )、3.24 (4H, s)、3.36 (4H, s)

300ml容フラスコに、上記で得られた4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)12.9g(0.04モル)を入れ、エタノール100mlを加えて溶解し、これにヨードオクタン24g(0.10モル)を加え、オイルバス中にて80℃、80MPaで24時間反応させた。反応混合物を減圧濃縮し、析出物を再結晶し、本発明のビス型第四アンモニウムアイオダイド( $n=8$ )を製造した。

【0034】実施例2~6

ヨードオクタンに代えて、ヨードオクタンと等モル量のヨードデカン(実施例2)、ヨードドデカン(実施例3)、ヨードテトラデカン(実施例4)、ヨードヘキサデカン(実施例5)又はヨードオクタデカン(実施例6)を使用する以外は、実施例1と同様に操作し、本発明のビス型第四アンモニウムアイオダイドを製造した。実施例1~6で得られた本発明ビス型第四アンモニウム

アイオダイドの元素分析値、融点及び収率を表1に示す。 \*【0035】

\*【表1】

実施例	n	元素分析値						融点 ℃	収率 %
		H		C		N			
		理論値	分析値	理論値	分析値	理論値	分析値		
1	8	6.53	6.21	46.39	46.21	3.49	3.29	147-149	64.0
2	10	7.04	7.23	48.95	48.65	3.26	3.23	165-171	76.0
3	12	7.49	7.52	51.2	51.08	3.06	3.09	175-180	60.0
4	14	7.89	7.65	53.19	53.24	2.88	2.7	184-187	29.0
5	16	8.24	8.54	54.96	54.82	2.73	2.65	185-187	44.0
6	18	8.56	8.85	56.55	56.25	2.59	2.39	170-180	39.0

【0036】これらの元素分析値は理論値と0.3%以内でよく一致し、さらに逆相TLC (DC-Fertigplatten RP-1 F254S, Schichtdicke 0.25 mm, E. Merck, ドイツ)の結果、実施例1~6の化合物全てがシングルスポットであった。以上より、目的の化合物が純品として得られていることを確認した。実施例3で得られた化合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを図1に示す。ケミカルシフト値及び積分値は、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物の構造をよく指示していた。また、他の実施例の化合物についてもNMRにより確認した(データ示さず)。以上の結果から、実施例1~6の化合物は、構造及び純度ともに目的のビス型第四アンモニウム塩化合物であることが確認された。また、ここではアイオダイドの結果を示しているが、ブロマイド塩及びクロライド塩についても、元素分析及びNMRによって目的の化合物で有ることを確認した(データ示さず)。

#### 【0037】試験例1

実施例3で得られた、本発明のビス第四アンモニウムアイオダイドについて、下記表2及び表3に示すグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に対する最小殺菌濃度及び最小発育阻止濃度を測定した。結果を表2及び表3に示す。

【0038】〔最小殺菌濃度(MBC)の測定〕以下の微生物実験は全て無菌フード(クリーンベンチ)内で行い、特に記載のない限り、微生物は氷冷下に保った。まず、細菌をL-培地(トリプトン1.0%(w/v)、酵母抽出エキス0.5%(w/v)、塩化ナトリウム0.5%(w/v)、pH7.0~7.2)5ml中で、37℃、18時間前培養した。この前培養菌体5mlをNB培地(Bascto nutrient broth、ディフコ・ラボトリス社製、米国)80mlの入った坂口フラスコに移植し、30℃で1.5時間培養し、対数増殖初期の菌体を得た。その菌体を遠心分離機(MODEL 50A-7、佐久間製作所)で冷却遠心分離(0℃、6000rpm、15分)により集菌後、無菌水で希釈し、分光光度計(UV-160、島津製作所)を用いて、菌懸濁液濃度が10<sup>6</sup>セル/ml(OD660=0.001)となるように調整した。殺菌試験については、80%のエチルアルコールを用いて調整した薬剤溶液を、無菌水で50倍希釈した後、2倍の10段階希釈した。各薬剤

0.5mlに上記の菌懸濁液0.5mlを接種し、30℃のウォーターバスシェーカー(P Personal Lt-10、タイテック)内で30分間振盪培養した。30分後、試験管から試料液0.1mlを分取し、NB培地2ml中に接種した。このNB判定培地を37℃で24時間培養し、増殖の有無(透明もしくは濁りを生じる)を肉眼で判定し、増殖の認められない(透明のままである)最小薬剤濃度を最小殺菌濃度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)とした。

【0039】〔最小発育阻止濃度(MIC)の測定法(液体培地希釈法)〕供試菌が細菌の場合は、供試菌をL-培地5mlに接種し、37℃において24時間培養した。この菌体を無菌水でOD660=0.1となるように調製し、NB培地で100倍希釈した菌体を使用した。供試菌が黴の場合は、サブロー寒天培地に一白金耳植菌し、7日間、30℃で培養した後、着生した胞子を0.2%(w/v)生理食塩水(消泡剤:Tween-80を含む)15mlを用いてかきとった。ガーゼを詰めたチップを使用し、黴をかきとった生理食塩水溶液を濾過し、胞子懸濁液とした。この胞子懸濁液をサブロー液体培地を用いて100倍希釈した菌体を用いた。静菌試験については、80%のエチルアルコールを用いて調製した薬剤溶液を、NB培地溶液(黴の場合はサブロー液体培地)で50倍希釈した後、2倍、10段階希釈した。次に所定濃度の希釈薬剤溶液をステンレスモルトン栓付き試験管に各々0.5mlを分注後、前述した希釈菌液をそれぞれ0.5ml接種し、37℃で24時間(黴の場合は30℃で7日間)静地培養後、増殖の有無により最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)を決定した。

【0040】

【表2】

最小殺菌濃度 (MBC, $\mu$ M)	本発明品
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	25.0
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	12.5
<i>Escherichia coli</i> K12 OUT 8401	50.0
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	50.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3.2
<i>Bacillus cereus</i> IFO 3001	6.3
<i>Bacillus megaterium</i> IFO 3003	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	25.0
<i>Staphylococcus aureus</i> JCl (MRSA)	12.5

【0041】

【表3】

最小発育阻止濃度 (MIC, $\mu$ M)	本発明品
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	6.3
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	6.3
<i>Escherichia coli</i> K12 OUT 8401	6.3
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6.3
<i>Bacillus cereus</i> IFO 3001	3.2
<i>Bacillus megaterium</i> IFO 3003	1.6
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	1.6
<i>Staphylococcus aureus</i> JCl (MRSA)	3.1

\*

	実施例	TBZ
<i>Aspergillus niger</i> IFO 6342	50.0	50
<i>Aspergillus niger</i> IFO 6341	25.0	50
<i>Aspergillus terreus</i> IFO 6346	12.5	200
<i>Penicillium funiculosum</i> IFO 6345	12.5	200
<i>Penicillium funiculosum</i> IFO 6352	12.5	50
<i>Chaetomium globosum</i> FERM S-11	6.3	6.3
<i>Aureobasidium pullulans</i> IFO 6353	12.5	1
<i>Glucoladium virens</i> IFO 6355	12.5	200
<i>Cladosporium cladosporioides</i> IFO6348	6.3	3.2

【0045】実施例7（ガラスビーズへの固定化）

トリメトキシシラン1gをエタノール1000mlに溶解し、これに脱脂処理を施したガラスビーズ（直径0.16mm）100gを加え、60℃の温度下に濃縮し、得られた残渣に水1000mlを加えて80℃で濃縮し、120℃で10時間乾燥し、シリル化ガラスビーズを製造した。このシリル化ガラスビーズ10gをエタノール/水（95/5体積%）50mlに湿潤させ、これに、実施例1と同様にして合成した4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス（ピリジニウム）80mg（250 $\mu$ mol）及びトリメトキシシラン56mg（500 $\mu$ mol）を加え、105℃で8時間静置した。その後、未固定物を取り除くために、エタノールでよく洗浄し、前記ビス（ピリジニウム）が固定化されたガラスビーズを製造した。前記ビス（ピリジニウム）が固定化されたガラスビーズ10gをエタノール50mlに湿潤させ、これにヨードオクタン

\*【0042】表2及び表3から、本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物が優れた抗菌性能を有することが判る。

【0043】試験例2

実施例3のビス型第四アンモニウムアイオダイド（n=12）、比較用の2-(4'-チアゾリル)ベンズイミダゾール（TBZ）について、その静菌活性を調べた。静菌活性は、サブロー寒天培地を用い、30℃で7日間培養し、培養物（broth）希釈法により測定した。結果を表4に示す。なお、TBZは強力な防黴剤として汎用されている。

【0044】

【表4】

20

150mg（625 $\mu$ mol）を加え、105℃にて8時間静置した後、未反応のハロゲン化アルカンを取り除くために、エタノールでよく洗浄し、一晚真空乾燥し、本発明のガラスビーズ固定化抗菌剤を製造した。

【0046】実施例8～12

4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-プロピレンジチオ)ビス（ピリジニウム）の使用量を300（実施例8）、400（実施例9）、500（実施例10）、750 $\mu$ mol（実施例11）又は1000 $\mu$ mol（実施例12）に変更すると共に、トリメトキシシランの使用量をそれぞれの2倍モル及びヨードオクタンの使用量をそれぞれの2.5倍モルとする以外は、実施例7と同様にして本発明のガラスビーズ固定化抗菌剤を製造した。上記で得られた抗菌剤において、本発明のビス型四級アンモニウム塩化合物がガラスビーズ上に固定化されていることを確認した。確認は、プロモフェノールブルー（以下「BPB」とする）が四級アンモニウム塩と

50

反応して結合することを利用し、次の様にして行った。  
実施例7～12で得られた抗菌剤に0.1 mM B P B  
リン酸緩衝液溶液 (pH 7) を接触させた後、上澄が透  
明になるまでエタノールで洗浄したところ濃い青色に染  
色され、四級塩の固定化が確認された。また、上澄にB  
P Bの溶出がないことから、固定化されていることも確  
認できた。未固定のガラスビーズについて、同様に調べ  
たが、染色は起こらなかった。

【0047】実施例13 (ガラスビーズへの固定化)  
実施例7と同様にして製造されたシリル化ガラスビーズ  
10 g と実施例1のビス型第四アンモニウムアイオダイ  
ド (n=8) 180 mg (250 μmol) とトリメトキ  
シラン56 mg (500 μmol) とを混合し、105  
°Cで8時間静置した後、エタノールで洗浄し、一晚真空  
乾燥し、本発明のガラス粉末固定化抗菌剤を製造した。  
得られた抗菌剤につき、上記のB P B染色法により、実  
施例1のビス型第四アンモニウムアイオダイドがガラス  
ビーズに固定化されていることが確認された。

【0048】試験例3  
実施例7～12で得られた固定化殺菌剤0.2 gを試験  
管に秤り取り、0.1 mM B P B溶液2 mlを1時間  
接触させ、B P B染色を行った。このB P B染色後の殺  
菌剤を50%メタノールで洗浄した。洗浄は、洗浄液の  
595.5 nmにおける吸収 (B P Bの吸収) が不検出  
になり、B P Bが検出されなくなるまで行った。次い  
で、このB P B染色殺菌剤に10%塩化ナトリウム/5  
0%メタノールを5 ml加えて超音波処理を15分間行  
い、B P Bを完全に溶出させた。上澄の595.5 nm  
の吸収 (A B S<sub>595.5</sub>) を測定し、検量線からB P  
B濃度を算出した。結果を図2に示す。図2において、  
縦軸はシリル化ビーズ1 g当りのB P B固定化率 (B P  
B濃度、μmol/g)、横軸は、化合物(7)に相当  
する4,4'-(2,2-ジヒドロキシメチル-1,3-  
プロピレンジチオ)ビス(ピリジニウム)の、シリル化  
ビーズ1 g当りの使用量 (実施例7=25、実施例8=  
30、実施例9=40、実施例10=50、実施例11  
=75、実施例12=100 μmol/g) をそれぞれ  
示す。図2から、化合物(7)の使用量に影響されるこ  
となく、ほぼ一定量がガラスビーズに固定化されている  
ことが判る。

【0049】試験例4～6 (殺菌試験)

\* 表5～6に示す供試菌をそれぞれL-培地5 mlに接種  
し、37°Cで18時間静置培養した定常期細胞を、無菌  
水で10<sup>8</sup> セル/mlとなるように調製したものを菌体  
懸濁液とした。100 mlの三角フラスコに、無菌水1  
0 mlと菌体懸濁液10 mlとを加え、実施例8で得ら  
れた固定化率0.28 μmol/gの本発明の抗菌剤を  
0.01 g加えた。それらを37°Cで振盪培養した。3  
0分後に培養液を0.1 mlずつ取り、ニュートリエント  
寒天の平板培地に塗布し、37°Cで24時間静置培養し  
た後、コロニー数を測定し、下記式により殺菌力 [L o  
g S (Survivor) (%) ] を求めた。尚、比較とし  
て、Dow Corning 5700、ダウ・コーニング社製、  
〔3-(トリメトキシシリル) プロピル〕 オクタデシル  
ジメチルアンモニウムクロライドを0.28 μmol/g  
の固定化率で、実施例7と同様にして固定化したガラ  
スビーズ固定化抗菌剤を用いて、同様に殺菌力を測定し  
た。結果を表5～6に示す。表5はグラム陽性菌に対す  
る殺菌試験結果を、表6はグラム陰性菌に対する殺菌試  
験結果を示す。

20 殺菌力  $\text{Log S (\%)} = \text{Log} [ (\text{残存生菌数} / \text{処理前} \\ \text{の菌数}) \times 100 ]$

【0050】使用培地：

1) L-培地：トリプトン (ディフコ・ラボラトリーズ  
社製) 10 g、酵母エキス (ディフコ・ラボラトリーズ  
社製) 5.0 g 及び塩化ナトリウム (関東化学 (株))  
製) 5.0 g を蒸留水1000 mlに溶解し、オートクレ  
ープにより滅菌した (pH 7.0～7.2)。

2) ニュートリエント (Nutrient) 培地

30 ニュートリエント培地 (ディフコ・ラボラトリーズ社製)  
8 g を蒸留水1000 mlに溶解し、オートクレープに  
より滅菌した (pH 6.8)。

3) ニュートリエント寒天培地

ニュートリエント培地 (ディフコ・ラボラトリーズ社製)  
8 g 及び寒天 (Bacto-Agar、ディフコ・ラボラトリ  
イズ社製) 15 g を蒸留水1000 mlに溶解し、オート  
クレープにより滅菌した (pH 7.0)。その後、滅  
菌済シャーレに約15 mlずつ入れ、無菌状態で固化さ  
せ、平板培地とした。

【0051】

40 【表5】

\*

供試菌	実施例8	Dow Corning 5700
	Log S (%)	Log S (%)
Staphylococcus aureus IFO 12732	-3.3	-2.0
Staphylococcus aureus IFO 12708	-3.5	-2.6
Staphylococcus aureus JCI (MRSA)	-3.1	-2.0
Micrococcus luteus IFO12708	-3.7	-2.1
Bacillus subtilis IFO 3134	-3.0	-2.0
Bacillus subtilis ATCC 6633	-3.2	-1.8
Bacillus cereus IFO 3001	-3.1	-2.0
Bacillus megaterium IFO 3003	-3.4	-1.8

【0052】

\* \* 【表6】

供試菌	実施例8	Dow Corning 5700
	Log S (%)	Log S (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 4352	-2.4	-1.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	-2.2	-0.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3080	-2.5	-1.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-4.0	-2.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	-3.7	-2.5
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	-2.8	-2.0
<i>Proteus rettgeri</i> NIE 96	-3.1	-2.0
<i>Escherichia coli</i> K12 OUT 8401	-0.9	1.0
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	-0.6	0.5

【0053】表5～6から、本発明のビス型第四アンモニウムアイオダイドをガラスビーズに固定化した抗菌剤が、グラム陽性及びグラム陰性を問わず、各種細菌類に対し、優れた殺菌効果を示すことが明らかである。

【0054】

【発明の効果】本発明のビス型第四アンモニウム塩化合物(1)は、従来のビス型第四アンモニウム塩と同等の抗菌性能(抗菌活性及び抗菌スペクトル)を示すと共に、ガラス粉末に固定化する場合には、従来のビス型第四アンモニウム塩よりも多量に固定化することができるという特性を有しているため、ガラス粉末に固定化した※

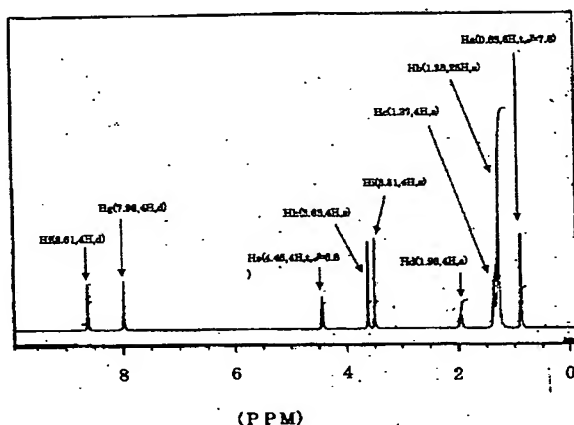
※時も、優れた抗菌活性が発揮され、特に細菌や真菌類に有効である。従って、応用範囲が広い実用的な抗菌剤になり、例えば、合成樹脂等への配合が非常に容易になる。

【図面の簡単な説明】

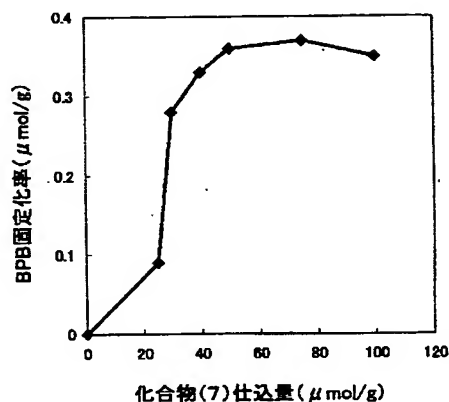
【図1】 実施例3のビス型第四アンモニウムアイオダイドの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルである。

【図2】 本発明のビス型第四アンモニウム塩をガラス粉末に固定化する場合の、該塩の使用量と該塩のガラス粉末への固定化量との関係を示すグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

テーマコード(参考)

A 61 L 9/01

A 61 L 9/01

K

A 61 P 31/04

A 61 P 31/04

M

(72)発明者 片岡 大也

徳島県徳島市南常三島町2丁目1 徳島大  
工学部内

F ターム(参考) 4C055 AA04 BA01 CA01 DA47 DB10  
DB16  
4C080 AA06 BB02 BB05 CC01 HH05  
JJ05 KK08 LL10 MM18 NN01  
4C083 AC851 BB48 CC01  
4C086 AA03 BC17 GA08 MA04 ZB35  
4H011 AA02 BA01 BB09 BC16 BC18  
DA02 DC05 DC11 DD07 DG16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**